

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-108682

(43)Date of publication of application : 28.04.1998

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07H 21/04
C12N 1/21
C12N 9/88
C12P 7/62
// (C12N 1/21
C12R 1:05)
(C12N 9/88
C12R 1:05)
(C12P 7/62
C12R 1:05)

(21)Application number : 09-199979

(71)Applicant : RIKAGAKU KENKYUSHO

(22)Date of filing : 25.07.1997

(72)Inventor : FUKUI TOSHIAKI
DOI YOSHIHARU

(30)Priority

Priority number : 08214509 Priority date : 14.08.1996 Priority country : JP

(54) POLYESTER POLYMERASE GENE AND PRODUCTION OF POLYESTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new gene for producing a transformant useful for producing a copolymer of a 3-hydroxyalkanoic acid, etc., comprising a gene coding a polypeptide which contains a specific amino acid sequence and brings about polyester polymerization activity.

SOLUTION: This new polyester polymerase gene codes a polypeptide containing an amino acid sequence of formula I or a sequence which is deficient in or replaced with one or several amino acids or to which one or several amino acids are added in the amino acid sequence and bringing about polyester polymerization activity and is useful for producing a poly (3-hydroxybutylate-3- hydroxyhexanoate) random copolymer which is a copolymer of an 3- hydroxyalkanoic acid of formula II (R is H or a 1-4C alkyl) and is excellent in biodegradability and biocompatibility. The gene is obtained by cloning a chromosome DNA library prepared from a chromosome DNA of *Aeromonas caviae* A FA440 strain by the use of a probe.

```

Met Ser Gly Phe Ser Tyr Gly Pro Leu Thr Glu Ala Leu Ala His Tyr
1      5      10      15
Asp Asp Leu Leu Ser Asn Ala Met Ala Lys Ala Glu Thr Glu Arg Thr Ala
20      25      30
Glu Ala Leu Leu Gly Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gly Val Leu Glu
35      40      45
Pro Ala Arg Val Pro Glu Gly Gly Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Tyr
50      55      60
Val Tyr Val Arg Leu Asn Pro Val Thr Ala Cys Thr Thr Glu Glu Asp
65      70      75
Ala Ala

```



11

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 26.07.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3062459

[Date of registration] 28.04.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-108682

(43) 公開日 平成10年(1998) 4月28日

| | | | |
|--------------------------------------|-------|---------------|---------|
| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | F I | |
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | C 1 2 N 15/00 | Z N A A |
| C 0 7 H 21/04 | | C 0 7 H 21/04 | B |
| C 1 2 N 1/21 | | C 1 2 N 1/21 | |
| 9/88 | | 9/88 | |
| C 1 2 P 7/62 | | C 1 2 P 7/62 | |
| 審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 25 頁) 最終頁に続く | | | |

| | | | |
|--------------|------------------|----------|-------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平9-199979 | (71) 出願人 | 000006792 理化学研究所 埼玉県和光市広沢2番1号 |
| (22) 出願日 | 平成9年(1997) 7月25日 | (72) 発明者 | 福居 俊昭 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内 |
| (31) 優先権主張番号 | 特願平8-214509 | (72) 発明者 | 土肥 義治 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所 内 |
| (32) 優先日 | 平8(1996) 8月14日 | (74) 代理人 | 弁理士 平木 祐輔 (外1名) |
| (33) 優先権主張国 | 日本 (J P) | | |

(54) 【発明の名称】 ポリエステル重合酵素遺伝子及びポリエステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法の提供。

【解決手段】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらしポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子、該ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方とを含む遺伝子発現カセット、前記ポリエステル合成酵素遺伝子又は遺伝子発現カセットを含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体、該形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたすポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項2】 配列番号1で表される塩基配列を含むポリエステル重合酵素遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2記載のポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方を含む遺伝子発現カセット。

【請求項4】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項5】 ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号3で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項6】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-C₆Aヒドラターゼ活性をもたすポリペプチドをコードするDNAを含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

【請求項7】 ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームが、配列番号5で表される塩基配列を含むものである請求項3記載の遺伝子発現カセット。

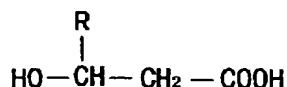
【請求項8】 請求項1若しくは2記載のポリエステル合成酵素遺伝子又は請求項3～7のいずれか1項に記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。

【請求項9】 請求項8記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項10】 請求項9記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法。

【請求項11】 ポリエステルが、次式I：

【化1】



(Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造方法。

【請求項12】 ポリエステルが、ポリ(3-ヒドロキシシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体である請求項10記載のポリエステルの製造

方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】数多くの微生物は、ポリ-3-ヒドロキシシブチレート(P(3HB))を生合成し、エネルギーの貯蔵物質として体内に微粒子状で蓄えることが知られている。微生物体内から抽出したP(3HB)は、180℃程度に融解温度をもつ熱可塑性高分子であり、優れた生分解性と生体適合性を示すことから、環境を保全する“グリーン”プラスチックとして注目されている。また、P(3HB)は各種の微生物を用いて糖や植物油などの再生可能炭素資源から合成できる“グリーン”プラスチックである。しかしながら、P(3HB)は、高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題があり、実用化が見送られてきた。

【0003】近年、3-ヒドロキシシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合ポリエステルP(3HB-co-3HH)およびその製造法について、研究、開発がなされ、たとえば、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報にそれぞれ記載されている。これらの公報のP(3HB-co-3HH)共重合体の製造法は、土より単離したアエロモナス・キャビエ(Aeromonas caviae)を用いてオレイン酸やオリーブオイルから発酵生産するものである。発酵生産したP(3HB-co-3HH)共重合体は、3HHユニット分率の増加とともに結晶化度が低下するために、柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れ、強い糸や透明でしなやかなフィルムにも加工できることが明らかにされている(Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolecules 28, 4822-4823 (1995))。しかしながら、特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報に記載の製造方法では、ポリエステル収率(乾燥微生物体内のポリエステル含有量)が低いため、P(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルを高収率で生産する方法の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ポリエステル重合酵素遺伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターによって形質転換された形質転換体及び該形質転換体を用いたポリエステルの製造方法を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ポリエステル重合酵素の遺伝子をクローニングし、さらにポリエステル重合酵素遺伝子に付随する上流及び下流のオープンリーディン

グフレームのいずれか一方又は両方を欠失させることによりポリエステルを高収率で生産することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、ポリエステル重合活性をもたらしポリペプチドをコードするポリエステル重合酵素遺伝子である。該遺伝子としては、例えば配列番号1で表される塩基配列を含むものが挙げられる。

【0007】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子と、該遺伝子の上流及び下流に存在するオープンリーディングフレームのいずれか一方を含む遺伝子発現カセットである。該遺伝子発現カセットにおいて、ポリエステル重合酵素遺伝子の上流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号4で表されるアミノ酸配列をコードするDNAを含むもの（例えば配列番号3）が挙げられ、ポリエステル重合酵素遺伝子の下流に存在するオープンリーディングフレームとしては、配列番号6で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加された配列を含み、エノイル-C₆Aヒドラーゼ活性をもたらしポリペプチドをコードするDNAを含むもの（例えば配列番号5）が挙げられる。

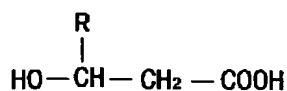
【0008】ここで、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において1個若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてても、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性を有する限り、そのポリペプチドをコードするDNAも本発明の遺伝子に含まれる。例えば、配列番号2で表されるアミノ酸配列の第1番目のメチオニンが欠失したものをコードするDNAも、本発明の遺伝子に含まれる。

【0009】さらに、本発明は、前記ポリエステル重合酵素遺伝子又は前記遺伝子発現カセットを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0010】さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からポリエステルを採取することを特徴とするポリエステルの製造方法である。ポリエステルとしては、例えば、次式I：

【0011】

【化2】



【0012】（Rは水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。）で示される3-ヒドロキシアルカン酸の共重合体（例えば、ポリ（3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノート）ランダム共重合体）が

挙げられる。以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

【発明の実施の形態】

(1) ポリエステル重合酵素遺伝子のクローニング

本発明のポリエステル重合酵素遺伝子は、アエロモナス属に属する微生物の菌体から分離される。まず、ポリエステル重合酵素遺伝子を有する菌株から染色体DNAを作製する。菌株としては、例えばアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) が挙げられる。

【0014】染色体DNAの調製は公知の方法を用いることができる。例えば、アエロモナス・キャビエをLB培地で培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 2.4.3 頁, John Wiley & Sons 出版, 1994年) 等により染色体DNAを調製する。

【0015】上記の手法により得られたDNAを適当な制限酵素（例えばSau3A1、BamHI、BglII等）で部分分解した後、アルカリホスファターゼ処理を行い、DNA断片を脱リン酸化する。これを制限酵素（例えばBamHI、BglII等）で切断したベクターとライゲーションを行い、ライブラリーを作成する。

【0016】ベクターには、宿主微生物で自律的に増殖し得るファージ又はプラスミドが使用される。ファージベクターとしては、例えばEMBL3、M13、λgt11等が挙げられ、プラスミドベクターとしては、例えばpBR322、pUC18、pBluescript II (STRATAGENE社製) 等が挙げられる。さらに、大腸菌やバチルス・プレビスなどの2種以上の宿主微生物で自律的増殖が可能なベクターのほか、各種のシャトルベクターを使用することもできる。このようなベクターについても、前記制限酵素で切断し、その断片を得ることができる。

【0017】DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後連結させ、組換えベクターを作成する。

【0018】宿主微生物に組換えベクターを導入するには、公知の方法により行うことができる。例えば、宿主微生物が大腸菌の場合はカルシウム法 (Lederberg, E.M. et al., J. Bacteriol. 119, 1072 (1974)) やエレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4 頁, 1994年) を採用することができ、宿主微生物がファージDNAの場合はインビトロ・パッケージング法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 5.7.1 頁, 1994年) 等を採用することができる。本発明では、インビトロ・パッケージング用キット (Gigapack II; STRATAGENE 社製等) を用いることもできる。

【0019】次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプロトコルを調製する。ポリエステル重合酵素のアミノ酸配列

については、既に何種類かのものが知られている (Peoples, O.P. and Sinskey, A.J., J.Biol.Chem., 264, 15293 (1989); Huisman, G.W. et al., J.Biol.Chem., 266, 2191 (1991); Pieper, U. et al., FEMS Microbiol.Lett., 96, 73 (1992) 他)。そこで、これらのアミノ酸配列のうち、保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定してオリゴヌクレオチドを設計する。これらオリゴヌクレオチドとしては、例えば5'-CC(C/G)CC(C/G)TGGATCAA(T/C)AAGT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3' (配列番号7)、及び5'-(G/C)AGCCA(G/C)GC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GGCCACCA-3' (配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドが挙げられるがこれらに限定されるものではない。

【0020】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャピエの染色体DNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応(PCR; Molecular Cloning, 2巻, 14.2頁, 1989年)を行う。そして、PCRによりポリエステル重合酵素遺伝子を部分的に増幅する。

【0021】次に、この部分増幅断片を適当な試薬を用いて標識し、前記染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーションを行う (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 6.0.3頁, 1994年)。

【0022】コロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングされた大腸菌からアルカリ法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.6.1頁, 1994年)によってプラスミドを回収することにより、ポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片が得られる。

【0023】上記DNA断片の塩基配列の決定は、公知方法、例えばサンガー法 (Molecular Cloning, 2巻, 13.3頁, 1989年)等によって行うことができ、塩基配列自動分析装置、例えば373A・DNA シークエンサー (Applied Biosystems社)等を用いて行うことができる。

【0024】配列番号1に本発明のポリエステル重合酵素遺伝子の塩基配列を、配列番号2に該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を示すが、当該アミノ酸配列を有するポリペプチドがポリエステル重合活性をもたらす限り、アミノ酸のいくつかについて欠失、置換、付加等の変異があってもよい。また、本発明の遺伝子は、配列番号2で表されるアミノ酸をコードする塩基配列をもつもののほか、縮重コドンにおいてのみ異なる同一のポリペプチドをコードする縮重異性体をも包含するものである。

【0025】なお、上記欠失等の変異は、公知の部位突然変異誘発方法 (Current Protocols in Molecular Biology 1巻, 8.1.1頁, 1994年)により誘発することができる。上記手法により塩基配列が決定された後は、化学合成によって、又は染色体DNAを鋳型としたPCR法によって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0026】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組み換えベクターを、該組み換えベクターを作製する際に用いた発現ベクターに適合する宿主中に導入することにより得られる。宿主としては、目的とする遺伝子を発現できるものであれば特に限定されず、例えば、アルカリゲネス属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物、バチルス属に属する微生物等の細菌、サッカロミセス属、カンジダ属等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞などが挙げられる。

【0027】アルカリゲネス属に属する微生物、シュードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として用いる場合は、本発明の組換え体DNAが該宿主中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、本発明のDNA、転写終結配列を含む構成であることが好ましい。発現ベクターとしては、広範囲の宿主において複製・保持されるRK2複製起点を有するpLA2917(ATCC 37355)、あるいはRSF1010複製起点を有するpJRD215(ATCC 37533)等が挙げられる。

【0028】プロモーターとしては、宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えば、irp プロモーター、lac プロモーター、P_L プロモーター、P_R プロモーター、T7プロモーターなどの大腸菌やファージ等に由来するプロモーターが用いられる。細菌への組み換え体DNAの導入方法としては、例えばカルシウムイオンを用いる方法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.1頁, 1994年)、エレクトロポレーション法 (Current Protocols in Molecular Biology, 1巻, 1.8.4頁, 1994年)等が挙げられる。

【0029】酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして、例えばYEpl3、YCp50等が挙げられる。プロモーターとしては、例えばgal 1 プロモーター、gal 10プロモーター等が挙げられる。酵母への組換え体DNAの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法 (Methods. Enzymol., 194, 182-187 (1990))、スフェロプラスト法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929-1933 (1987))、酢酸リチウム法 (J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983))等が挙げられる。

【0030】動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1、pcDNA1/Amp (インビトロジェン社)等が用いられる。動物細胞への組換え体DNAの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法等が挙げられる。

【0031】ここで、前記のようにして決定された塩基配列は、ポリエステル重合酵素遺伝子のほかに、その上流及び下流にポリエステル生合成に関与する遺伝子のオープンリーディングフレームが複数含まれている。すなわち、ポリエステル重合酵素遺伝子は、単一のプロモーター領域の支配下に少なくとも2個のORFとともにオペロンを形成している。

【0032】ポリエステル重合酵素遺伝子上流に位置するORFを以下「ORF1」といい、下流に位置するORFを以下「ORF3」という。ORF1は、菌体内ポリエステルの蓄積に関与する遺伝子又はポリエステル生合成系遺伝子のものであると思われる。また、ORF3は、ポリエステル生合成に関与するエノイル-C_oAヒドラーゼ（特に（R）-特異的エノイル-C_oAヒドラーゼ）をコードする遺伝子のものであることを明らかにした。

【0033】本発明では、図1に示すように、発現制御領域（図1(i)において「-35/-10」と表示）、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF1及びORF3を含むEcoRI断片をクローニングした（図1(i)）。この断片をEE32とする。

【0034】次に、EE32においてORF1又はORF3のいずれか一方又は両方を欠失させた断片（遺伝子発現カセット）を作製し、このカセットを宿主に導入することにより、ポリエステルを効率よく生産することができる形質転換体を得ることができる。

【0035】EE32中、発現制御領域とORF1の翻訳開始領域との間、及びORF1の翻訳停止領域とポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳開始領域との間にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglIIによりORF1を欠失させる（図1(2)）。これと同様にして、ポリエステル重合酵素遺伝子の翻訳停止領域とORF3との間に制限酵素BamHI領域を挿入し、BamHI処理によりORF3を欠失させる（図1(3)）。

【0036】ORF1及びORF3の両者を欠失させるには、EE32について、上記ORF1及びORF3を欠失させる操作を両方行えばよい（図1(4)）。なお、制限酵素部位は、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異法（Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1 頁, 1994年）によって導入することができる。

【0037】このようにして得られたそれぞれの遺伝子発現カセットを、前記発現可能なプラスミド（例えばpJRD215（ATCC 37533））に挿入し、得られた組換えベクターを用いて、アルカリゲネス・ユートロファス（*Alcaligenes eutrophus*）・PHB-4株（DSM541）（ポリエステル合成能欠損株）を形質転換する。形質転換法としては、例えば塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、低pH法、インビトロ・パッケージングによる方法、接合伝達法等が挙げられる。

【0038】(3) ポリエステルの製造
ポリエステルの製造は、本発明の形質転換体を培地で培養し、培養菌体又は培養物中に本発明のポリエステルを生成蓄積させ、該培養菌体又は培養物から該ポリエステルを採取することにより行われる。本発明の形質転換体を培地で培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0039】アルカリゲネス属に属する微生物又はシュードモナス属に属する微生物等の細菌を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源を与え、窒素源、無機塩類及び有機栄養源のうちのいずれかを制限した培地、例えば窒素源を0.01～0.1%に制限した培地が挙げられる。

【0040】炭素源は微生物の増殖に必要であり、かつ、ポリエステル合成の原料となるものであり、その例としては、例えばグルコース、フラクトース、スクロース、マルトース等の炭水化物が挙げられる。また、炭素数2以上の油脂関連物質を炭素源とすることもできる。炭素数2以上の油脂関連物質としては、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油又は牛油などの天然油脂、酢酸、プロピオン酸、ブタン酸、ペンタン酸、ヘキサン酸、オクタン酸、デカン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸若しくはミリスチン酸等の脂肪酸又はこれら脂肪酸のエステル、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール若しくはパルミチルアルコール等又はこれらアルコールのエステル等が挙げられる。

【0041】窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩の他、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステイープリカー等が挙げられる。無機物としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム等が挙げられる。

【0042】培養は、通常振盪培養などの好気的条件下、25～37℃で発現誘導後24時間以上（例えば1～7日）行う。培養中は、カナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。そして、培養することによりポリエステルを菌体内に蓄積させ、その後、このポリエステルを回収する。

【0043】誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、インデューサーを培地に添加することもできる。例えば、イソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）、インドールアクリル酸（IAA）等を培地に添加することができる。

【0044】動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えばRPMI-1640、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清を添加した培地が用いられる。培養は、通常5%CO₂存在下、30～37℃で14～28日間行う。培養中はカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

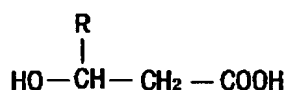
【0045】本発明において、ポリエステルの精製は例えば以下のように行うことができる。培養液から遠心分離によって形質転換体を集め、蒸留水で洗浄した後、乾燥させる。その後、クロロホルムに乾燥形質転換体を懸

濁し、加熱することによってポリエステルを抽出する。なお、濾過によって残渣を取り除く。このクロロホルム溶液にメタノールを加えてポリエステルの沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去した後、乾燥して精製ポリエステルの得る。

【0046】得られたポリエステルが目的のものであることの確認は、通常の方法、例えばガスクロマトグラフ法、核磁気共鳴法等により行う。本発明の遺伝子はアエロモナス・キャビエから単離したポリエステル重合酵素をコードする遺伝子を含んでいる。この重合酵素は、次式I:

【0047】

【化3】



【0048】(Rは水素原子又は炭素数1~4のアルキル基を表す。)で示される3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとした共重合体(ポリエステル)を合成することが可能である。上記共重合体としては、例えばポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))等が挙げられ、前記重合酵素遺伝子を導入した形質転換体はP(3HB-co-3HH)を極めて高効率で生産する能力を示す。

【0049】従来では、ポリ-3-ヒドロキシブチレート(P(3HB))あるいはポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HV))の製造法について研究、開発がなされたが、これらのポリエステルは高結晶性高分子のために耐衝撃性が劣るという物性上の問題がある。

【0050】炭素数6の3-ヒドロキシヘキサノエートをポリマー鎖に導入することによって結晶化度が低下するため、ポリエステルは柔軟な高分子材料となり、熱安定性や成形性にも優れるが、アエロモナス・キャビエを用いた従来のP(3HB-co-3HH)製造法(特開平5-93049号公報および特開平7-265065号公報)では、ポリエステルの収率が低い。

【0051】これに対し、本発明ではP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステルの高収率で生産することができる。上記手法により目的とするポリエステルの大量に得ることができるため、これを用いて生分解性の糸やフィルム、各種容器等の素材として利用することができる。また、本発明の遺伝子を用いてP(3HB-co-3HH)共重合ポリエステル高生産株を育種することもできる。

【0052】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例にその技術的範囲を限定するものではない。

【実施例1】アエロモナス・キャビエのポリエステル重

合酵素遺伝子のクローニング

最初に、アエロモナス・キャビエの染色体DNAライブラリーを作製した。

【0053】アエロモナス・キャビエFA440株を100mlのLB培地(1%イーストエキス、0.5%トリプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、pH7.5)中、30℃で終夜培養した後、臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 2.4.3.頁, 1994年; John Wiley & Sons

出版)により染色体DNAを得た。

【0054】得られた染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解した。またベクタープラスミドについては、コスミドベクターであるpLA2917(ATCC37355)を使用した。このプラスミドを制限酵素BglIIIで切断し、脱リン酸化処理(Molecular Cloning, 1巻, 5.7.2頁, 1989年; Cold Spring Harbor Laboratory 出版)を施した後、DNAリガーゼを用いて染色体DNA部分分解断片と連結させた。

【0055】この連結DNA断片を用いたインビトロ・パッケージング法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 5.7.2頁, 1994年)によって大腸菌S17-1株を形質転換し、アエロモナス・キャビエ染色体DNAライブラリーを得た。

【0056】次に、アエロモナス・キャビエのポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得るためのプローブを調製した。これまでに知られている数種のポリエステル重合酵素のアミノ酸配列でよく保存されている2つの領域を選択し、それをコードする核酸塩基配列を推定して5'-CC(C/G)CC(C/G)TGGATCA(T/C)AAGT(T/A)(T/C)TA(T/C)ATC-3'(配列番号7)、及び5'-(G/C)AGCCA(G/C)GC(G/C)GTCCA(A/G)TC(G/C)GCCACCA-3'(配列番号8)で表される2種類のオリゴヌクレオチドを合成した。

【0057】これらのオリゴヌクレオチドをプライマーとし、アエロモナス・キャビエの染色体DNAを鋳型としたPCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を部分増幅した。PCRは、94℃で30秒、50℃で30秒及び72℃で60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。この部分増幅断片をDIG DNA 標識キット(ベリンガー・マンハイム社製)によってジグキシゲニン標識し、プローブとした。

【0058】得られたプローブを用いてアエロモナス・キャビエ染色体DNAライブラリーからコロニーハイブリダイゼーション法によってポリエステル重合酵素遺伝子を含むプラスミドを有する大腸菌を単離した。この大腸菌からアルカリ法によってプラスミドを回収することでポリエステル重合酵素遺伝子を含むDNA断片を得た。この断片のBglIII-EcoRI断片についてサンガー法によって塩基配列を決定した。その結果、配列番号9又は10で表される3.2kbp断片の塩基配列が決定された。

【0059】さらに、この塩基配列について相同性検索を行った結果、この3.2kbpの塩基配列の中には、配列番号1で表される塩基配列(1785bp)を含むポリエステル重合酵素遺伝子を同定することができた。なお、本発明においては、本発明のポリエステル重合酵素遺伝子によりコードされるタンパク質が、ポリエステル重合の遺伝子発現機能を有する限り、当該遺伝子の塩基配列に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。

【0060】また、配列番号9又は10で表される塩基配列を有する断片において、上記1785bpの塩基配列の下流に存在する405bpの遺伝子(ORF3)及び転写終結領域、並びに上流に存在する354bpの遺伝子(ORF1)及び発現調節領域を同定した。ORF1の塩基配列を配列番号3、ORF1によりコードされるアミノ酸配列を配列番号4に、ORF3の塩基配列を配列番号5、ORF3によりコードされるアミノ酸配列を配列番号6に示す。ここで、ORF3はポリエステル合成に関与するエノイル-COAヒドラーゼをコードする遺伝子のものである。そして、ORF3によりコードされるアミノ酸を有するポリペプチドがエノイル-COAヒドラーゼ活性、特に(R)-特異的エノイル-COAヒドラーゼ活性をもたらす限り、当該アミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。また、配列番号9及び10で表される塩基配列において、発現調節領域は第1~383番目であり、転写終結領域は第3010~3187番目である。

【0061】〔実施例2〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体の作製
実施例1で同定された発現調節領域、ORF1、ポリエステル重合酵素遺伝子、ORF3及び転写終結領域を含むBglII-EcoRI断片のBglII部位をEcoRIリンカーを用いてEcoRI部位とし、3.2kbpのEcoRI-EcoRI断片(EE32断片)を得た。これをアルカリゲネス属に属する微生物中で発現可能なプラスミドpJRD215(ATCC37533)に挿入し、得られた組換えプラスミドでアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株(DSM541)(ポリエステル合成能欠損株)を接合伝達法によって形質転換した。

【0062】すなわち、まず、この組換えプラスミドを用いて大腸菌S17-1株を塩化カルシウム法によって形質転換した。この組換え大腸菌とアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株をLB培地1.5ml中、30℃で終夜培養し、それぞれの培養液0.1mlを混合し、30℃で4時間培養した。この菌体混合液をMBF寒天培地(0.9%リン酸ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム、0.5%フルクトース、1.5%寒天、0.3mg/mlカナマイシン)に塗布し、30℃で5日間培養した。

【0063】組換え大腸菌中のプラスミドがアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株に伝達されるとカナマイシン耐性を示すことから、MBF寒天培地上で増殖したコロニーはアルカリゲネス・ユートロファス形質転換体

である。この中から1個のコロニーを単離し、アルカリゲネス・ユートロファスAC32株(以下、AC32株と呼ぶ)を得た。なお、AC32株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-15786として寄託されている。

【0064】さらに合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異法(Currnt Protocols in Molecular Biology, 1巻, 8.1.1 頁, 1994年)によってEE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を導入し、BglII-BglII断片を欠失させることによってORF1遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC321株と呼ぶ。

【0065】同様に、部位特異的変異法によってEE32断片中のORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF3遺伝子が欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC323株と呼ぶ。

【0066】同様に、EE32断片中のORF1遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BglII部位を、ORF3遺伝子の前後にそれぞれ制限酵素BamHI部位を導入し、BglII-BglII断片およびBamHI-BamHI断片を欠失させることによってORF1遺伝子およびORF3遺伝子が共に欠失した断片を作製し、プラスミドpJRD215に挿入した。この組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC3213株と呼ぶ。

【0067】さらに、EE32断片を鋳型とし、PCR法によってポリエステル重合酵素遺伝子を増幅し、得られた増幅断片を、公知であるアルカリゲネス・ユートロファス由来ポリエステル合成系遺伝子の発現調節領域と転写終結領域との間に挿入した。PCRは、5'-AGTTCCCGCCTCGGCTGTGGGTGAA-3'(配列番号11)および5'-GGCATATGCGCTCATGCGGCTCCT-3'(配列番号12)をプライマーとして、94℃で30秒、55℃で30秒及び72℃で60秒の反応を1サイクルとしてこれを30サイクル行った。

【0068】このDNA断片をプラスミドpJRD215に挿入し、得られた組換えプラスミドを用いて、上述の接合伝達法によってアルカリゲネス・ユートロファスPHB-4株を形質転換した。得られた形質転換体を、以下AC29株と呼ぶ。

【0069】〔実施例3〕アルカリゲネス・ユートロファス形質転換体によるポリエステル合成
アルカリゲネス・ユートロファスH16株、PHB-4

株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株、AC29株を、それぞれ、95mlのMB培地(0.9%リン酸二ナトリウム、0.15%リン酸一カリウム、0.05%塩化アンモニウム)に1mlの1%オクタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で培養した。AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株及びAC29株についてはカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%オクタン酸ナトリウムを添加しつつ(オクタン酸ナトリウムの総添加量0.5g)、72時間培養した。

【0070】H16株、及びAC3213株については上述のMB培地に1%オリーブ油、パーム油、コーン油、あるいはオレイン酸を加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で72時間培養した。なお、AC3213株を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。

【0071】H16株、AC32株、AC321株、AC323株、AC3213株については上述のMB培地に1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを加えた培地に植菌し、坂口フラスコ中、30℃で培養した。なお、AC32株、AC321株、AC323株、及びAC3213株

を培養する際には、培地にカナマイシンを0.2g/Lの濃度で含有させた。12時間、24時間、36時間及び48時間経過後にそれぞれ1mlの1%ヘプタン酸ナトリウムを添加しつつ(ヘプタン酸ナトリウムの総添加量0.5g)、72時間培養した。

【0072】培養後、遠心分離によって菌体を回収し、蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量を測定した。乾燥菌体10~30mgに2mlの硫酸-メタノール混液(15:85)と2mlのクロロホルムを添加して密栓し、100℃で140分間加熱することにより、菌体内ポリエステル分解物のメチルエステルを得た。これに1mlの蒸留水を添加して激しく攪拌した。静置して二層に分離させた後、下層の有機層を取り出し、その組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーによって分析した。ガスクロマトグラフは島津製作所製GC-14A、キャピラリーカラムはGLサイエンス社製NEUTRA BOND-1(カラム長25m、カラム内径0.25mm、液膜厚0.4μm)を用いた。温度条件は、初発温度100℃から8℃/分の速度で昇温した。得られた結果を表1、表2、および表3に示す。

【0073】

【表1】

表1 オクタン酸を炭素源としたポリエステル合成

| 使用菌株 | 乾燥菌体重量 (g/l) | ポリエステル含量 (重量%) | ポリエステル組成 3HB (モル%) | 3HH |
|--------|-----------------|-------------------|--------------------------|-----|
| H16 | 3.00 | 86 | 100 | 0 |
| PHB-4 | 0.80 | 0 | - | - |
| AC32 | 0.99 | 33 | 78 | 23 |
| AC321 | 2.85 | 92 | 87 | 13 |
| AC323 | 2.85 | 92 | 88 | 12 |
| AC3213 | 3.64 | 96 | 85 | 15 |
| AC29 | 3.20 | 94 | 92 | 8 |

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0074】

【表2】

表2 植物油またはオレイン酸を炭素源としたポリエステル合成

| 使用菌株 | 炭素源 | 乾燥菌体重量 (g/l) | ポリエステル含量 (重量%) | ポリエステル組成 3HB (モル%) | 3HH |
|--------|-------|-----------------|-------------------|--------------------------|-----|
| H16 | オリーブ油 | 4.27 | 79 | 100 | 0 |
| | コーン油 | 3.57 | 81 | 100 | 0 |
| | パーム油 | 4.13 | 79 | 100 | 0 |
| | オレイン酸 | 4.06 | 82 | 100 | 0 |
| AC3213 | オリーブ油 | 3.54 | 76 | 96 | 4 |
| | コーン油 | 3.60 | 77 | 95 | 5 |
| | パーム油 | 3.58 | 81 | 96 | 4 |
| | オレイン酸 | 2.22 | 70 | 96 | 4 |

3HB: 3-ヒドロキシブチレート、3HH: 3-ヒドロキシヘキサノエート

【0075】

【表3】

表3 ヘプタン酸を炭素源としたポリエステル合成

| 使用菌株 | 乾燥菌体重量 (g/l) | ポリエステル含量 (重量%) | ポリエステル組成 | | |
|--------|-----------------|-------------------|----------|-----|------|
| | | | 3HB | 3HV | 3HHp |
| H16 | 2.50 | 60 | 50 | 50 | 0 |
| AC32 | 0.77 | 7 | 30 | 67 | 5 |
| AC321 | 1.67 | 55 | 46 | 52 | 2 |
| AC323 | 1.27 | 40 | 48 | 45 | 7 |
| AC3213 | 2.76 | 67 | 44 | 48 | 8 |

3HB : 3-ヒドロキシブチレート、3HV : 3-ヒドロキシバリレート
3HHp : 3-ヒドロキシヘプタノエート

【0076】オクタン酸を炭素源とした場合、表1に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーを合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数6の3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)を基質としないためである。そのポリエステル合成能欠損株であるPHB-4株では変異処理によってポリエステル重合酵素が欠損しているため、ポリエステルを蓄積しない。PHB-4株にアエロモナス・キャピエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HH(3-ヒドロキシヘキサノエート)分率22モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3ヒドロキシヘキサノエート)ランダム共重合体(P(3HB-co-3HH))を乾燥菌体重量あたり33重量%蓄積した。

【0077】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HH分率12~15モル%のP(3HB-co-3HH)を92~96重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された。

【0078】また、導入したポリエステル重合酵素遺伝子の発現調節領域および転写終結領域をアルカリゲネス・ユートロファス由来のものに置換したAC29株でも、94重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積し、由来の異なる発現調節領域および転写終結領域を使用してもポリエステル収率が著しく改善された。

【0079】最もポリエステル収率の高いAC3213株をオリーブ油、コーン油、パーム油を炭素源として培養したところ、表2に示すように3HH分率4~5モル%のP(3HB-co-3HH)を76~81重量%蓄積した。植物油に最も多く含まれる脂肪酸成分であるオレイン酸を炭素源としても3HH分率4モル%のP(3HB-co-3HH)を70重量%で蓄積した。野生株であるH16株はこの条件下でポリ(3-ヒドロキシブチレート)ホモポリマーのみを合成した。

【0080】なお、アエロモナス・キャピエFA440株では、パルミチン酸を炭素源として8重量%のP(3HB-co-3HH)を蓄積することが報告されている(特開平7-265065号公報)。本発明においてはオクタン酸を炭素源として96重量%のP(3HB-co-3HH)が、また極めて安価である植物油を炭素源として76~81重量%のP(3HB-co-

3HH)が蓄積されることから、公報記載の方法と比較すると、本実施例で使用した形質転換体によるP(3HB-co-3HH)合成法は極めて優れた方法であると言える。

【0081】ヘプタン酸を炭素源とした場合、表2に示すようにアルカリゲネス・ユートロファス野生株であるH16株ではポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート)共重合体(P(3HB-co-3HV))を合成する。これはH16株の有するポリエステル重合酵素は炭素数7の3HHp(3-ヒドロキシヘプタノエート)を基質としないためである。PHB-4株にアエロモナス・キャピエ由来のポリエステル重合酵素遺伝子を含むEE32断片を導入したAC32株では3HHp分率5モル%のポリ(3-ヒドロキシブチレート-3-ヒドロキシバリレート-3-ヒドロキシヘプタノエート)三元共重合体(P(3HB-co-3HV-co-3HHp))を乾燥菌体重量あたり7重量%蓄積した。

【0082】さらに、AC321株、AC323株、AC3213株では3HHp分率2~8モル%のP(3HB-co-3HV-co-3HHp)を40~67重量%蓄積し、ORF1遺伝子、ORF3遺伝子、あるいはその両方を欠失させることでポリエステル収率が著しく改善された(表3)。

【0083】これらの結果から、アエロモナス・キャピエ由来のポリエステル重合酵素は炭素数4~7の3-ヒドロキシアリカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することができると言える。

【0084】〔実施例4〕ORF3の機能同定
EE32断片を鋳型として、PCR法によってORF3遺伝子を増幅し、発現プラスミドPET-3a(ノバジェン社製)のT7プロモーター下流に挿入した。PCRは5'-GCCATATGAGCGCACAATCCCTGGAAGTAG-3'(配列番号13)および5'-CTGGGATCCGCCGTGCTTAAGGCAGCTTG-3'(配列番号14)をプライマーとして、95℃で60秒、68℃で30秒の反応を1サイクルとして25サイクル行った。得られたプラスミドを用いて大腸菌BL21(DE3)株(ノバジェン社製)を形質転換した。得られた形質転換体を以下、NB3株とする。

【0085】NB3株を100mlのLB培地で30℃、4時間培養し、イソプロピルチオガラクトピラノシド(IPTG)を最終濃度0.4mMとなるように添加して発現を誘導し、さらに30℃で2時間培養した。菌体を遠心分離によ

って回収した後、超音波破碎、遠心分離によって可溶性タンパク画分を得た。表4に示すように、発現プラスミドを導入した菌体の可溶性画分には高いエノイル-CoA

Aヒドラターゼ活性が検出された。

【0086】

【表4】

表4 可溶性タンパク画分のエノイル-CoAヒドラターゼ比活性
(ユニット/mgタンパク)

| | |
|-----------------------|------|
| 大腸菌BL21(DE3) 株/PET-3a | 0 |
| 大腸菌NB3 株 | 1700 |

【0087】エノイル-CoAヒドラターゼ活性はクロトニル-CoA (シグマ社製) を基質とし(濃度0.25mM)、2重結合の水和に伴う吸光度変化(263nm)を測定することにより求めた。一方、ORF3遺伝子を挿入していないコントロールプラスミドPET-3aを導入した大腸菌株では活性はまったく検出されなかった。

【0088】そこで、エノイル-CoAヒドラターゼタンパクの精製を行った。NB3株の可溶性タンパク画分をQ-セファロース陰イオン交換カラム(ファルマシア

社製)に負荷し、塩化ナトリウム濃度勾配(0Mから1M)によってタンパクを溶出させ、エノイル-CoAヒドラターゼ活性画分を回収した。活性画分のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析から、図2に示すように電気泳動的に均一であることがわかった。また表5に示すように比活性を約3倍に向上させることができた。

【0089】

【表5】

表5 エノイル-CoAヒドラターゼ比活性
(ユニット/mgタンパク)

| | |
|------------------|------|
| 大腸菌NB3株可溶性タンパク画分 | 1700 |
| 陰イオン交換カラム溶出画分 | 5100 |

【0090】得られた精製エノイル-CoAヒドラターゼタンパクのN末端アミノ酸配列を決定したところ、表6に示すように開始コドンであるMet 以外のアミノ酸配列は、ORF3遺伝子の塩基配列から推定したアミノ酸

配列と一致した。

【0091】

【表6】

表6 アミノ酸配列の比較

| | |
|---------------------------------|--------------------------------|
| 精製エノイル-CoAヒドラターゼ N-末端アミノ酸配列: | SAQSLEVGQKARLSKRFGAA (配列番号15) |
| ORF3塩基配列から の推定アミノ酸配列: | MSAQSLEVGQKARLSKRFGAA (配列番号16) |

【0092】このことから、ORF3がエノイル-CoAヒドラターゼをコードしていることが確認できた。Metは翻訳後修飾によって脱離したものと考えられる。また、ORF3にコードされるエノイル-CoAヒドラターゼの立体特異性について以下のように検討した。

【0093】活性測定の反応溶液に(S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAデヒドロゲナーゼ(シグマ社製)(最終濃度0.2 ユニット/ml)と酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)(最終濃度0.5mM)を添加すると、エノイル-CoAヒドラターゼの特異性が(S)-体特異的であれば、生成した(S)-3-ヒドロキシブチリル-CoAはデヒドロゲナーゼの作用によってアセトアセチル-CoAに酸化される。それ

に伴ってNAD⁺は還元されてNADHが生成し、340nmに特異的な吸収を生じる。逆にエノイル-CoAヒドラターゼが(R)-体特異的であれば、NADHは生成しない。

【0094】表7に示すように、ORF3にコードされるエノイル-CoAヒドラターゼを用いた場合では、340nmの吸光度変化はエノイル-CoAヒドラターゼ無添加の場合とほとんど同じであったが、市販の(S)-特異のエノイル-CoAヒドラターゼ(シグマ社製)を用いた場合では、NADHの生成に伴う吸光度変化が見られた。

【0095】

【表7】

表7 1分後の340nmにおける吸光度変化

| | |
|-----------------------------------|-------|
| エノイル-CoAヒドラターゼ無添加 | 0.045 |
| ORF3由来エノイル-CoAヒドラターゼ | 0.047 |
| (S)-体特異のエノイル-CoAヒドラターゼ (シグマ社製) | 0.146 |

【0096】この結果から、精製エノイル-CoAヒドラターゼは(R)-体特異的であることが明らかとなった。従って、ORF3は(R)-体特異のエノイル-Co

oAヒドラターゼをコードしていることが分かった。

【0097】

【発明の効果】本発明により、ポリエステル重合酵素遺

伝子、該遺伝子を含む組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体及びポリエステルの製造方法が提供される。本発明の遺伝子は、炭素数4～7の3-ヒドロキシアルカン酸をモノマーユニットとする共重合ポリエステルを合成することが可能なポリエステル重合酵素をコードしている点で、また、本発明の製造方法は、熱安定性や成形性に優れた生分解性プラスチックであるP(3HB-co-3HH)を効率よく合成可能である点で有用である。

【0098】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1785

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列：

| | |
|---|-----|
| ATG AGC CAA CCA TCT TAT GGC CCG CTG TTC GAG GCC CTG GCC CAC TAC | 48 |
| Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr | |
| 1 5 10 15 | |
| AAT GAC AAG CTG CTG GCC ATG GCC AAG GCC CAG ACA GAG CGC ACC GCC | 96 |
| Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala | |
| 20 25 30 | |
| CAG GCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC GAT CTG GGC CAG GTG CTG GAG | 144 |
| Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu | |
| 35 40 45 | |
| CAG GGC AGC CAG CAA CCC TGG CAG CTG ATC CAG GCC CAG ATG AAC TGG | 192 |
| Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp | |
| 50 55 60 | |
| TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG CAC ACC CTG CTC AAA AGC GCA | 240 |
| Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala | |
| 65 70 75 80 | |
| GGC CAG CCG AGC GAG CCG GTG ATC ACC CCG GAG CGC AGC GAT CGC CGC | 288 |
| Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg | |
| 85 90 95 | |
| TTC AAG GCC GAG GCC TGG AGC GAA CAA CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG | 336 |
| Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys | |
| 100 105 110 | |
| CAG TCC TAC CTG CTC ACC GCC AGG CAC CTG CTG GCC TCG GTG GAT GCC | 384 |
| Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala | |
| 115 120 125 | |
| CTG GAG GGC GTC CCC CAG AAG AGC CGG GAG CGG CTG CGT TTC TTC ACC | 432 |
| Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr | |
| 130 135 140 | |
| CGC CAG TAC GTC AAC GCC ATG GCC CCC AGC AAC TTC CTG GCC ACC AAC | 480 |
| Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn | |
| 145 150 155 160 | |
| CCC GAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG TCC GAC GGC CAG AAC CTG GTG | 528 |
| Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val | |
| 165 170 175 | |
| CGC GGA CTG GCC CTC TTG GCC GAG GAT CTG GAG CGC AGC GCC GAT CAG | 576 |
| Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln | |
| 180 185 190 | |
| CTC AAC ATC CGC CTG ACC GAC GAA TCC GCC TTC GAG CTC GGC CGG GAT | 624 |
| Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp | |
| 195 200 205 | |
| CTG GCC CTG ACC CCG GGC CGG GTG GTG CAG CGC ACC GAG CTC TAT GAG | 672 |
| Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu | |

| | | | |
|---|-----|-----|------|
| 210 | 215 | 220 | |
| CTC ATT CAG TAC AGC CCG ACT ACC GAG ACG GTG GGC AAG ACA CCT GTG | | | 720 |
| Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 |
| CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG TAC TAC ATC ATG GAC ATG CGG | | | 768 |
| Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg | | | |
| 245 | 250 | 255 | |
| CCC CAG AAC TCC CTG GTC GCC TGG CTG GTC GCC CAG GGC CAG ACG GTA | | | 816 |
| Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val | | | |
| 260 | 265 | 270 | |
| TTC ATG ATC TCC TGG CGC AAC CCG GGC GTG GCC CAG GCC CAA ATC GAT | | | 864 |
| Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp | | | |
| 275 | 280 | 285 | |
| CTC GAC GAC TAC GTG GTG GAT GGC GTC ATC GCC GCC CTG GAC GGC GTG | | | 912 |
| Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val | | | |
| 290 | 295 | 300 | |
| GAG GCG GCC ACC GGC GAG CGG GAG GTG CAC GGC ATC GGC TAC TGC ATC | | | 960 |
| Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 |
| GGC GGC ACC GCC CTG TCG CTC GCC ATG GGC TGG CTG GCG GCG CGG CGC | | | 1008 |
| Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg | | | |
| 325 | 330 | 335 | |
| CAG AAG CAG CGG GTG CGC ACC GCC ACC CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC | | | 1056 |
| Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp | | | |
| 340 | 345 | 350 | |
| TTC TCC CAG CCC GGG GAG CTT GGC ATC TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA | | | 1104 |
| Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile | | | |
| 355 | 360 | 365 | |
| GCG GCG CTC GAG GCG CAA AAT GAG GCC AAG GGC ATC ATG GAC GGG CGC | | | 1152 |
| Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg | | | |
| 370 | 375 | 380 | |
| CAG CTG GCG GTC TCC TTC AGC CTG CTG CGG GAG AAC AGC CTC TAC TGG | | | 1200 |
| Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 |
| AAC TAC TAC ATC GAC AGC TAC CTC AAG GGT CAG AGC CCG GTG GCC TTC | | | 1248 |
| Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe | | | |
| 405 | 410 | 415 | |
| GAT CTG CTG CAC TGG AAC AGC GAC AGC ACC AAT GTG GCG GGC AAG ACC | | | 1296 |
| Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr | | | |
| 420 | 425 | 430 | |
| CAC AAC AGC CTG CTG CGC CGT CTC TAC CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG | | | 1344 |
| His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys | | | |
| 435 | 440 | 445 | |
| GGG GAG CTC AAG ATC CGC AAC ACC CGC ATC GAT CTC GGC AAG GTG AAG | | | 1392 |
| Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys | | | |
| 450 | 455 | 460 | |
| ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG GCG GTG GAC GAT CAC ATC GCC CTC TGG | | | 1440 |
| Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp | | | |
| 465 | 470 | 475 | 480 |
| CAG GGC ACC TGG CAG GGC ATG AAG CTG TTT GGC GGC GAG CAG CGC TTC | | | 1488 |

| | | | |
|---|-----------------|---------------------------------|------|
| Gln Gly Thr Trp | Gln Gly Met Lys | Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe | |
| | 485 | 490 | 495 |
| CTC CTG GCG GAG TCC GGC CAC ATC GCC GGC ATC ATC AAC CCG CCG GCC | | | 1536 |
| Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala | | | |
| | 500 | 505 | 510 |
| GCC AAC AAG TAC GGC TTC TGG CAC AAC GGG GCC GAG GCC GAG AGC CCG | | | 1584 |
| Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro | | | |
| | 515 | 520 | 525 |
| GAG AGC TGG CTG GCA GGG GCG ACG CAC CAG GGC GGC TCC TGG TGG CCC | | | 1632 |
| Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro | | | |
| | 530 | 535 | 540 |
| GAG ATG ATG GGC TTT ATC CAG AAC CGT GAC GAA GGG TCA GAG CCC GTC | | | 1680 |
| Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val | | | |
| | 545 | 550 | 555 |
| CCC GCG CGG GTC CCG GAG GAA GGG CTG GCC CCC GCC CCC GGC CAC TAT | | | 1728 |
| Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr | | | |
| | 565 | 570 | 575 |
| GTC AAG GTG CGG CTC AAC CCC GTG TTT GCC TGC CCA ACA GAG GAG GAC | | | 1776 |
| Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp | | | |
| | 580 | 585 | 590 |
| GCC GCA TGA | | | 1785 |
| Ala Ala | | | |

【0099】配列番号：2

配列の長さ：594

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

| | |
|---|--|
| Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr | |
| 1 5 10 15 | |
| Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala | |
| 20 25 30 | |
| Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu | |
| 35 40 45 | |
| Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp | |
| 50 55 60 | |
| Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln His Thr Leu Leu Lys Ser Ala | |
| 65 70 75 80 | |
| Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg | |
| 85 90 95 | |
| Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys | |
| 100 105 110 | |
| Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala | |
| 115 120 125 | |
| Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr | |
| 130 135 140 | |
| Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn | |
| 145 150 155 160 | |
| Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val | |
| 165 170 175 | |
| Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln | |
| 180 185 190 | |

Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp
 195 200 205
 Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu
 210 215 220
 Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu Thr Val Gly Lys Thr Pro Val
 225 230 235 240
 Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg
 245 250 255
 Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu Val Ala Gln Gly Gln Thr Val
 260 265 270
 Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp
 275 280 285
 Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile
 305 310 315 320
 Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg
 325 330 335
 Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp
 340 345 350
 Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile Phe Ile His Glu Pro Ile Ile
 355 360 365
 Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg
 370 375 380
 Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp
 385 390 395 400
 Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe
 405 410 415
 Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr
 420 425 430
 His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys
 435 440 445
 Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys
 450 455 460
 Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val Asp Asp His Ile Ala Leu Trp
 465 470 475 480
 Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe
 485 490 495
 Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala
 500 505 510
 Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro
 515 520 525
 Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro
 530 535 540
 Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val
 545 550 555 560
 Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr
 565 570 575
 Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp
 580 585 590

Ala Ala

【0100】配列番号：3

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列：

```

ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC TTT ACC GAG CAG ATG CAA GGC      48
Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly
   1             5             10             15
TTC GCC GCC CCC CTC ACC CGC TAC AAC CAG CTG CTG GCC AGC AAC ATC      96
Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn
Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile
                        20                        25

                        30
GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG GCC
TCC GCC AAC GCC TAC GCC GAA      144
Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala
Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu
                        35                        40

                        45
CTG GGC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG
AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG      192
Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val
Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln
                        50                        55

                        60
AGC CTG GCG GCC CTG GGC ACA GTG CAA
CTG GAG ACC GCC AGC CAG CTC      240
Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln
Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu
65                        70

                        75                        80
TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG
AAG CTG AGC GCC CTC GGC CAG      288
Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln
Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln
                        85

90                        95
CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG
ACC GCA GAC GGC ATC AAG AAA      336
Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu
Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys
                        100                        105

                        110
AGC ACG GGC AAG GCC TGA
                        354

Ser Thr Gly Lys Ala
115

```

【0101】配列番号：4

配列の長さ：117

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列:

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Met | Asn | Met | Asp | Val | Ile | Lys | Ser | |
| Phe | Thr | Glu | Gln | Met | Gln | Gly | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | |
| 10 | | | | | 15 | | | | |
| Phe | Ala | Ala | Pro | Leu | Thr | Arg | Tyr | Asn | |
| Gln | Leu | Leu | Ala | Ser | Asn | Ile | | | |
| | | | 20 | | | | | | 25 |
| | | | | 30 | | | | | |
| Glu | Gln | Leu | Thr | Arg | Leu | Gln | Leu | Ala | |
| Ser | Ala | Asn | Ala | Tyr | Ala | Glu | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | |
| | | | 45 | | | | | | |
| Leu | Gly | Leu | Asn | Gln | Leu | Gln | Ala | Val | |
| Ser | Lys | Val | Gln | Asp | Thr | Gln | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | |
| | | 60 | | | | | | | |
| Ser | Leu | Ala | Ala | Leu | Gly | Thr | Val | Gln | |
| Leu | Glu | Thr | Ala | Ser | Gln | Leu | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | |
| | 75 | | | | | 80 | | | |
| Ser | Arg | Gln | Met | Leu | Asp | Asp | Ile | Gln | |
| Lys | Leu | Ser | Ala | Leu | Gly | Gln | | | |
| | | | | 85 | | | | | |
| 90 | | | | | 95 | | | | |
| Gln | Phe | Lys | Glu | Glu | Leu | Asp | Val | Leu | |
| Thr | Ala | Asp | Gly | Ile | Lys | Lys | | | |
| | | | 100 | | | | | | 105 |
| | | | | 110 | | | | | |
| Ser | Thr | Gly | Lys | Ala | | | | | |
| | | 115 | | | | | | | |

【0102】配列番号: 5

配列の長さ: 405

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

配列:

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ATG | AGC | GCA | CAA | TCC | CTG | GAA | GTA | GGC | |
| CAG | AAG | GCC | CGT | CTC | AGC | AAG | | | 48 |
| Met | Ser | Ala | Gln | Ser | Leu | Glu | Val | Gly | |
| Gln | Lys | Ala | Arg | Leu | Ser | Lys | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | |
| 10 | | | | | 15 | | | | |
| CGG | TTC | GGG | GCG | GCG | GAG | GTA | GCC | GCC | |
| TTC | GCC | GCG | CTC | TCG | GAG | GAC | | | 96 |
| Arg | Phe | Gly | Ala | Ala | Glu | Val | Ala | Ala | |
| Phe | Ala | Ala | Leu | Ser | Glu | Asp | | | |
| | | | 20 | | | | | | 25 |
| | | | | 30 | | | | | |
| TTC | AAC | CCC | CTG | CAC | CTG | GAC | CCG | GCC | |
| TTC | GCC | GCC | ACC | ACG | GCG | TTC | | | 144 |
| Phe | Asn | Pro | Leu | His | Leu | Asp | Pro | Ala | |

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Phe | Ala | Ala | Thr | Thr | Ala | Phe | | | |
| | | 35 | | | | | 40 | | |
| | | | 45 | | | | | | |
| GAG | CGG | CCC | ATA | GTC | CAC | GGC | ATG | CTG | |
| CTC | GCC | AGC | CTC | TTC | TCC | GGG | | 192 | |
| Glu | Arg | Pro | Ile | Val | His | Gly | Met | Leu | |
| Leu | Ala | Ser | Leu | Phe | Ser | Gly | | | |
| | 50 | | | | | 55 | | | |
| | | 60 | | | | | | | |
| CTG | CTG | GGC | CAG | CAG | TTG | CCG | GGC | AAG | |
| GGG | AGC | ATC | TAT | CTG | GGT | CAA | | 240 | |
| Leu | Leu | Gly | Gln | Gln | Leu | Pro | Gly | Lys | |
| Gly | Ser | Ile | Tyr | Leu | Gly | Gln | | | |
| 65 | | | | | 70 | | | | |
| | 75 | | | | | 80 | | | |
| AGC | CTC | AGC | TTC | AAG | CTG | CCG | GTC | TTT | |
| GTC | GGG | GAC | GAG | GTG | ACG | GCC | | 288 | |
| Ser | Leu | Ser | Phe | Lys | Leu | Pro | Val | Phe | |
| Val | Gly | Asp | Glu | Val | Thr | Ala | | | |
| | | | | 85 | | | | | |
| 90 | | | | | 95 | | | | |
| GAG | GTG | GAG | GTG | ACC | GCC | CTT | CGC | GAG | |
| GAC | AAG | CCC | ATC | GCC | ACC | CTG | | 336 | |
| Glu | Val | Glu | Val | Thr | Ala | Leu | Arg | Glu | |
| Asp | Lys | Pro | Ile | Ala | Thr | Leu | | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | |
| | | | | 110 | | | | | |
| ACC | ACC | CGC | ATC | TTC | ACC | CAA | GGC | GGC | |
| GCC | CTC | GCC | GTG | ACG | GGG | GAA | | 384 | |
| Thr | Thr | Arg | Ile | Phe | Thr | Gln | Gly | Gly | |
| Ala | Leu | Ala | Val | Thr | Gly | Glu | | | |
| | | 115 | | | | | 120 | | |
| | | | 125 | | | | | | |
| GCC | GTG | GTC | AAG | CTG | CCT | TAA | | | |
| | | | | | | | 405 | | |
| Ala | Val | Val | Lys | Leu | Pro | | | | |
| | 130 | | | | | | | | |

【0103】配列番号：6

配列の長さ：134

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Met | Ser | Ala | Gln | Ser | Leu | Glu | Val | Gly | |
| Gln | Lys | Ala | Arg | Leu | Ser | Lys | | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | |
| 10 | | | | | 15 | | | | |
| Arg | Phe | Gly | Ala | Ala | Glu | Val | Ala | Ala | |
| Phe | Ala | Ala | Leu | Ser | Glu | Asp | | | |
| | | | 20 | | | | | 25 | |
| | | | | 30 | | | | | |
| Phe | Asn | Pro | Leu | His | Leu | Asp | Pro | Ala | |

```

Phe  Ala  Ala  Thr  Thr  Ala  Phe
          35                                40
                                45
Glu  Arg  Pro  Ile  Val  His  Gly  Met  Leu
Leu  Ala  Ser  Leu  Phe  Ser  Gly
          50                                55
                                60
Leu  Leu  Gly  Gln  Gln  Leu  Pro  Gly  Lys
Gly  Ser  Ile  Tyr  Leu  Gly  Gln
          65                                70
                                75                                80
Ser  Leu  Ser  Phe  Lys  Leu  Pro  Val  Phe
Val  Gly  Asp  Glu  Val  Thr  Ala
                                85
          90                                95
Glu  Val  Glu  Val  Thr  Ala  Leu  Arg  Glu
Asp  Lys  Pro  Ile  Ala  Thr  Leu
                                100                                105
                                110
Thr  Thr  Arg  Ile  Phe  Thr  Gln  Gly  Gly
Ala  Leu  Ala  Val  Thr  Gly  Glu
                                115                                120
                                125
Ala  Val  Val  Lys  Leu  Pro
          130

```

【0104】配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列：

CCSCCSTGGA TCAAYAAGTW YTAYATC

27

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0105】配列番号：8

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列：

SAGCCASGCS GTCCARTCSG GCCACCA

27

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0106】配列番号：9

配列の長さ：3187

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列：

```

AGATCTGGAC CGGGGTGCTG GCCTGGGCCA CGCCGGCGAG GGCCAGCGCG GAGCAACCGA 60
GCAGCAGGCG GAGAGGTTTC ATCGGGATTC CTTGGCAGTC TGAATGACGT GCCAGCCTAT 120
CAGCGCGGCG CCGGTGCGGC GAGGCGCGCG CGGACCCAGT GCGTCACCTC TCGTCTGATC 180
CGCCTCCCTC GACGGGCGTC GCTGACAAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA 240
TTTACACCAA ACCGCATTTC GTTGCAGAAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAAC AGAGCAAGCA 300
ACACGTAAAC AGGGATGACA TGCAGTACCC GTAAGAAGGG CCGATTGGCC CACAACAACA 360
CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CCG ATG ATG AAT ATG GAC GTG ATC AAG AGC 410

```

Met Met Asn Met Asp Val Ile Lys Ser

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：384..734

特徴を表す記号：CDS

存在位置：830..2611

| | | | |
|---|------|---|--|
| | 1 | 5 | |
| TTT ACC GAG CAG ATG CAA GGC TTC GCC GCC CCC CTC ACC CGC TAC AAC | 458 | | |
| Phe Thr Glu Gln Met Gln Gly Phe Ala Ala Pro Leu Thr Arg Tyr Asn | | | |
| 10 15 20 25 | | | |
| CAG CTG CTG GCC AGC AAC ATC GAA CAG CTG ACC CGG TTG CAG CTG GCC | 506 | | |
| Gln Leu Leu Ala Ser Asn Ile Glu Gln Leu Thr Arg Leu Gln Leu Ala | | | |
| 30 35 40 | | | |
| TCC GCC AAC GCC TAC GCC GAA CTG GGC CTC AAC CAG TTG CAG GCC GTG | 554 | | |
| Ser Ala Asn Ala Tyr Ala Glu Leu Gly Leu Asn Gln Leu Gln Ala Val | | | |
| 45 50 55 | | | |
| AGC AAG GTG CAG GAC ACC CAG AGC CTG GCG GCC CTG GGC ACA GTG CAA | 602 | | |
| Ser Lys Val Gln Asp Thr Gln Ser Leu Ala Ala Leu Gly Thr Val Gln | | | |
| 60 65 70 | | | |
| CTG GAG ACC GCC AGC CAG CTC TCC CGC CAG ATG CTG GAT GAC ATC CAG | 650 | | |
| Leu Glu Thr Ala Ser Gln Leu Ser Arg Gln Met Leu Asp Asp Ile Gln | | | |
| 75 80 85 | | | |
| AAG CTG AGC GCC CTC GGC CAG CAG TTC AAG GAA GAG CTG GAT GTC CTG | 698 | | |
| Lys Leu Ser Ala Leu Gly Gln Gln Phe Lys Glu Glu Leu Asp Val Leu | | | |
| 90 95 100 105 | | | |
| ACC GCA GAC GGC ATC AAG AAA AGC ACG GGC AAG GCC TGATAACCCC | 744 | | |
| Thr Ala Asp Gly Ile Lys Lys Ser Thr Gly Lys Ala | | | |
| 110 115 | | | |
| TGGCTGCCCC TTCGGGCAGC CACATCTCCC CATGACTCGA CGCTACGGGC TAGTTCCCGC | 804 | | |
| CTCGGGTGTG GGTGAAGGAG AGCAC ATG AGC CAA CCA TCT TAT GGC CCG CTG | 856 | | |
| Met Ser Gln Pro Ser Tyr Gly Pro Leu | | | |
| 1 5 | | | |
| TTC GAG GCC CTG GCC CAC TAC AAT GAC AAG CTG CTG GCC ATG GCC AAG | 904 | | |
| Phe Glu Ala Leu Ala His Tyr Asn Asp Lys Leu Leu Ala Met Ala Lys | | | |
| 10 15 20 25 | | | |
| GCC CAG ACA GAG CGC ACC GCC CAG GCG CTG CTG CAG ACC AAT CTG GAC | 952 | | |
| Ala Gln Thr Glu Arg Thr Ala Gln Ala Leu Leu Gln Thr Asn Leu Asp | | | |
| 30 35 40 | | | |
| GAT CTG GGC CAG GTG CTG GAG CAG GGC AGC CAG CAA CCC TGG CAG CTG | 1000 | | |
| Asp Leu Gly Gln Val Leu Glu Gln Gly Ser Gln Gln Pro Trp Gln Leu | | | |
| 45 50 55 | | | |
| ATC CAG GCC CAG ATG AAC TGG TGG CAG GAT CAG CTC AAG CTG ATG CAG | 1048 | | |
| Ile Gln Ala Gln Met Asn Trp Trp Gln Asp Gln Leu Lys Leu Met Gln | | | |
| 60 65 70 | | | |
| CAC ACC CTG CTC AAA AGC GCA GGC CAG CCG AGC GAG CCG GTG ATC ACC | 1096 | | |
| His Thr Leu Leu Lys Ser Ala Gly Gln Pro Ser Glu Pro Val Ile Thr | | | |
| 75 80 85 | | | |
| CCG GAG CGC AGC GAT CGC CGC TTC AAG GCC GAG GCC TGG AGC GAA CAA | 1144 | | |
| Pro Glu Arg Ser Asp Arg Arg Phe Lys Ala Glu Ala Trp Ser Glu Gln | | | |
| 90 95 100 105 | | | |
| CCC ATC TAT GAC TAC CTC AAG CAG TCC TAC CTG CTC ACC GCC AGG CAC | 1192 | | |
| Pro Ile Tyr Asp Tyr Leu Lys Gln Ser Tyr Leu Leu Thr Ala Arg His | | | |
| 110 115 120 | | | |
| CTG CTG GCC TCG GTG GAT GCC CTG GAG GGC GTC CCC CAG AAG AGC CGG | 1240 | | |
| Leu Leu Ala Ser Val Asp Ala Leu Glu Gly Val Pro Gln Lys Ser Arg | | | |
| 125 130 135 | | | |

| | |
|---|------|
| GAG CGG CTG CGT TTC TTC ACC CGC CAG TAC GTC AAC GCC ATG GCC CCC | 1288 |
| Glu Arg Leu Arg Phe Phe Thr Arg Gln Tyr Val Asn Ala Met Ala Pro | |
| 140 145 150 | |
| AGC AAC TTC CTG GCC ACC AAC CCC GAG CTG CTC AAG CTG ACC CTG GAG | 1336 |
| Ser Asn Phe Leu Ala Thr Asn Pro Glu Leu Leu Lys Leu Thr Leu Glu | |
| 155 160 165 | |
| TCC GAC GGC CAG AAC CTG GTG CGC GGA CTG GCC CTC TTG GCC GAG GAT | 1384 |
| Ser Asp Gly Gln Asn Leu Val Arg Gly Leu Ala Leu Leu Ala Glu Asp | |
| 170 175 180 185 | |
| CTG GAG CGC AGC GCC GAT CAG CTC AAC ATC CGC CTG ACC GAC GAA TCC | 1432 |
| Leu Glu Arg Ser Ala Asp Gln Leu Asn Ile Arg Leu Thr Asp Glu Ser | |
| 190 195 200 | |
| GCC TTC GAG CTC GGG CGG GAT CTG GCC CTG ACC CCG GGC CGG GTG GTG | 1480 |
| Ala Phe Glu Leu Gly Arg Asp Leu Ala Leu Thr Pro Gly Arg Val Val | |
| 205 210 215 | |
| CAG CGC ACC GAG CTC TAT GAG CTC ATT CAG TAC AGC CCG ACT ACC GAG | 1528 |
| Gln Arg Thr Glu Leu Tyr Glu Leu Ile Gln Tyr Ser Pro Thr Thr Glu | |
| 220 225 230 | |
| ACG GTG GGC AAG ACA CCT GTG CTG ATA GTG CCG CCC TTC ATC AAC AAG | 1576 |
| Thr Val Gly Lys Thr Pro Val Leu Ile Val Pro Pro Phe Ile Asn Lys | |
| 235 240 245 | |
| TAC TAC ATC ATG GAC ATG CGG CCC CAG AAC TCC CTG GTC GCC TGG CTG | 1624 |
| Tyr Tyr Ile Met Asp Met Arg Pro Gln Asn Ser Leu Val Ala Trp Leu | |
| 250 255 260 265 | |
| GTC GCC CAG GGC CAG ACG GTA TTC ATG ATC TCC TGG CGC AAC CCG GGC | 1672 |
| Val Ala Gln Gly Gln Thr Val Phe Met Ile Ser Trp Arg Asn Pro Gly | |
| 270 275 280 | |
| GTG GCC CAG GCC CAA ATC GAT CTC GAC GAC TAC GTG GTG GAT GGC GTC | 1720 |
| Val Ala Gln Ala Gln Ile Asp Leu Asp Asp Tyr Val Val Asp Gly Val | |
| 285 290 295 | |
| ATC GCC GCC CTG GAC GGC GTG GAG GCG GCC ACC GGC GAG CGG GAG GTG | 1768 |
| Ile Ala Ala Leu Asp Gly Val Glu Ala Ala Thr Gly Glu Arg Glu Val | |
| 300 305 310 | |
| CAC GGC ATC GGC TAC TGC ATC GGC GGC ACC GCC CTG TCG CTC GCC ATG | 1816 |
| His Gly Ile Gly Tyr Cys Ile Gly Gly Thr Ala Leu Ser Leu Ala Met | |
| 315 320 325 | |
| GGC TGG CTG GCG GCG CGG CGC CAG AAG CAG CGG GTG CGC ACC GCC ACC | 1864 |
| Gly Trp Leu Ala Ala Arg Arg Gln Lys Gln Arg Val Arg Thr Ala Thr | |
| 330 335 340 345 | |
| CTG TTC ACT ACC CTG CTG GAC TTC TCC CAG CCC GGG GAG CTT GGC ATC | 1912 |
| Leu Phe Thr Thr Leu Leu Asp Phe Ser Gln Pro Gly Glu Leu Gly Ile | |
| 350 355 360 | |
| TTC ATC CAC GAG CCC ATC ATA GCG GCG CTC GAG GCG CAA AAT GAG GCC | 1960 |
| Phe Ile His Glu Pro Ile Ile Ala Ala Leu Glu Ala Gln Asn Glu Ala | |
| 365 370 375 | |
| AAG GGC ATC ATG GAC GGG CGC CAG CTG GCG GTC TCC TTC AGC CTG CTG | 2008 |
| Lys Gly Ile Met Asp Gly Arg Gln Leu Ala Val Ser Phe Ser Leu Leu | |
| 380 385 390 | |
| CGG GAG AAC AGC CTC TAC TGG AAC TAC TAC ATC GAC AGC TAC CTC AAG | 2056 |
| Arg Glu Asn Ser Leu Tyr Trp Asn Tyr Tyr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys | |

```

395          400          405
GGT CAG AGC CCG GTG GCC TTC GAT CTG CTG CAC TGG AAC AGC GAC AGC 2104
Gly Gln Ser Pro Val Ala Phe Asp Leu Leu His Trp Asn Ser Asp Ser
410          415          420          425
ACC AAT GTG GCG GGC AAG ACC CAC AAC AGC CTG CTG CGC CGT CTC TAC 2152
Thr Asn Val Ala Gly Lys Thr His Asn Ser Leu Leu Arg Arg Leu Tyr
          430          435          440
CTG GAG AAC CAG CTG GTG AAG GGG GAG CTC AAG ATC CGC AAC ACC CGC 2200
Leu Glu Asn Gln Leu Val Lys Gly Glu Leu Lys Ile Arg Asn Thr Arg
          445          450          455
ATC GAT CTC GGC AAG GTG AAG ACC CCT GTG CTG CTG GTG TCG GCG GTG 2248
Ile Asp Leu Gly Lys Val Lys Thr Pro Val Leu Leu Val Ser Ala Val
          460          465          470
GAC GAT CAC ATC GCC CTC TGG CAG GGC ACC TGG CAG GGC ATG AAG CTG 2296
Asp Asp His Ile Ala Leu Trp Gln Gly Thr Trp Gln Gly Met Lys Leu
          475          480          485
TTT GGC GGG GAG CAG CGC TTC CTC CTG GCG GAG TCC GGC CAC ATC GCC 2344
Phe Gly Gly Glu Gln Arg Phe Leu Leu Ala Glu Ser Gly His Ile Ala
490          495          500          505
GGC ATC ATC AAC CCG CCG GCC GCC AAC AAG TAC GGC TTC TGG CAC AAC 2392
Gly Ile Ile Asn Pro Pro Ala Ala Asn Lys Tyr Gly Phe Trp His Asn
          510          515          520
GGG GCC GAG GCC GAG AGC CCG GAG AGC TGG CTG GCA GGG GCG ACG CAC 2440
Gly Ala Glu Ala Glu Ser Pro Glu Ser Trp Leu Ala Gly Ala Thr His
          525          530          535
CAG GGC GGC TCC TGG TGG CCC GAG ATG ATG GGC TTT ATC CAG AAC CGT 2488
Gln Gly Gly Ser Trp Trp Pro Glu Met Met Gly Phe Ile Gln Asn Arg
          540          545          550
GAC GAA GGG TCA GAG CCC GTC CCC GCG CGG GTC CCG GAG GAA GGG CTG 2536
Asp Glu Gly Ser Glu Pro Val Pro Ala Arg Val Pro Glu Glu Gly Leu
          555          560          565
GCC CCC GCC CCC GGC CAC TAT GTC AAG GTG CGG CTC AAC CCC GTG TTT 2584
Ala Pro Ala Pro Gly His Tyr Val Lys Val Arg Leu Asn Pro Val Phe
570          575          580          585
GCC TGC CCA ACA GAG GAG GAC GCC GCA TGAGCGCACA ATCCCTGGAA 2631
Ala Cys Pro Thr Glu Glu Asp Ala Ala
          590
GTAGGCCAGA AGGCCGTCT CAGCAAGCGG TTCGGGGCGG CGGAGGTAGC CGCCTTCGCC 2691
GCGCTCTCGG AGGACTTCAA CCCCTGCAC CTGGACCCGG CCTTCGCCGC CACCACGGCG 2751
TTCGAGCGGC CCATAGTCCA CGGCATGCTG CTCGCCAGCC TCTTCTCCGG GCTGCTGGGC 2811
CAGCAGTTGC CGGGCAAGGG GAGCATCTAT CTGGGTCAA GCCTCAGCTT CAAGCTGCCG 2871
GTCTTTGTCG GGGACGAGGT GACGGCCGAG GTGGAGGTGA CCGCCCTTCG CGAGGACAAG 2931
CCCATCGCCA CCCTGACCAC CCGCATCTTC ACCCAAGGCG GCGCCCTCGC CGTGACGGGG 2991
GAAGCCGTGG TCAAGCTGCC TTAAGCACCG GCGGCACGCA GGCACAATCA GCGCGCCCC 3051
TGCCGGGCTG ATTGTCTCC CCCGCTCCGC TTGCCCCCTT TTTCGGGGCA ATTTGGCCCA 3111
GGCCCTTTCC CTGCCCCGCC TAACTGCCTA AAATGGCCGC CCTGCCGTGT AGGCATTCAT 3171
CCAGCTAGAG GAATTC
          3187

```

【0107】配列番号：10

配列の長さ：3187

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA

配列の特徴

存在位置: 2611..3012

特徴を表す記号: CDS

配列:

AGATCTGGAC CGGGGTGCTG GCCTGGGCCA CGCCGGCGAG GGCCAGCGCG GAGCAACCGA 60
 GCAGCAGGCG GAGAGGTTTC ATCGGGATTC CTTGGCAGTC TGAATGACGT GCCAGCCTAT 120
 CAGCGCGGCG CCGGTGCCGC GAGGGCGCGC CGGACCCAGT GCGTCACCTC TCGTCTGATC 180
 CGCCTCCCTC GACGGGCGTC GCTGACAAAA AAATTCAAAC AGAAATTAAC ATTTATGTCA 240
 TTTACACCAA ACCGCATTTG GTTGACAGAAT GCTCAAACGT GTGTTTGAAC AGAGCAAGCA 300
 ACACGTAAAC AGGGATGACA TGCAGTACCC GTAAGAAGGG CCGATTGGCC CACAACAACA 360
 CTGTTCTGCC GAACTGGAGA CCGATGATGA ATATGGACGT GATCAAGAGC TTTACCGAGC 420
 AGATGCAAGG CTTCGCCGCC CCCCTACCC GCTACAACCA GCTGCTGGCC AGCAACATCG 480
 AACAGCTGAC CCGTTGCGAG CTGGCTCCG CCAACGCCTA CGCCGAACCTG GGCCTCAACC 540
 AGTTGCAGGC CGTGAGCAAG GTGCAGGACA CCCAGAGCCT GCGGCCCTG GGCACAGTGC 600
 AACTGGAGAC CGCCAGCCAG CTCTCCCGCC AGATGCTGGA TGACATCCAG AAGCTGAGCG 660
 CCCTCGGCCA GCAGTTCAAG GAAGAGCTGG ATGTCCTGAC CGCAGACGGC ATCAAGAAAA 720
 GCACGGGCAA GGCCTGATAA CCCCTGGCTG CCGGTTCCGG CAGCCACATC TCCCCATGAC 780
 TCGACGCTAC GGGCTAGTTC CCGCTCGGG TGTGGGTGAA GGAGAGCACA TGAGCCAACC 840
 ATCTTATGGC CCGCTGTTG AGGCCCTGGC CCACTACAAT GACAAGCTGC TGGCCATGGC 900
 CAAGGCCCAG ACAGAGCGCA CCGCCAGGC GCTGCTGCAG ACCAATCTGG ACGATCTGGG 960
 CCAGGTGCTG GAGCAGGGCA GCCAGCAACC CTGGCAGCTG ATCCAGGCC AGATGAACTG 1020
 GTGGCAGGAT CAGCTCAAGC TGATGCAGCA CACCCTGCTC AAAAGCGCAG GCCAGCCGAG 1080
 CGAGCCGGTG ATCACCCTCG AGCGCAGCGA TCGCCGCTTC AAGGCCGAGG CCTGGAGCGA 1140
 ACAACCCATC TATGACTACC TCAAGCAGTC CTACCTGCTC ACCGCCAGGC ACCTGCTGGC 1200
 CTCGGTGGAT GCCCTGGAGG GCGTCCCCA GAAGAGCCGG GAGCGGCTGC GTTCTTTCAC 1260
 CCGCCAGTAC GTCAACGCCA TGGCCCCCAG CAACTTCCTG GCCACCAACC CCGAGCTGCT 1320
 CAAGCTGACC CTGGAGTCCG ACGGCCAGAA CCTGGTGCGC GGAAGTGGCC TCTTGGCCGA 1380
 GGATCTGGAG CGCAGCGCCG ATCAGCTCAA CATCCGCTG ACCGACGAAT CCGCCTTCGA 1440
 GCTCGGGCGG GATCTGGCCC TGACCCCGGG CCGGGTGGTG CAGCGCACCG AGTCTATGA 1500
 GCTCATTAG TACAGCCCGA CTACCGAGAC GGTGGGCAAG ACACCTGTGC TGATAGTGCC 1560
 GCCCTTATC AACAAGTACT ACATCATGGA CATGCGGCC CAGAACTCCC TGGTCGCCTG 1620
 GCTGGTCGCC CAGGGCCAGA CGGTATTCAT GATCTCCTGG CGCAACCCGG GCGTGGCCCA 1680
 GGCCCAAATC GATCTCGACG ACTACGTGGT GGATGGCGTC ATCGCCGCC TGGACGGCGT 1740
 GGAGGCGGCC ACCGGCGAGC GGGAGGTGCA CGGCATCGGC TACTGCATCG GCGGCACCGC 1800
 CCTGTGCTC GCCATGGGCT GGCTGGCGGC GCGGCGCCAG AAGCAGCGGG TCGCACCGC 1860
 CACCCTGTT ACTACCTGC TGGACTTCTC CCAGCCCGG GAGCTTGGCA TCTTCATCCA 1920
 CGAGCCCATC ATAGCGGCGC TCGAGGCGCA AAATGAGGCC AAGGCATCA TGGACGGCG 1980
 CCAGCTGGCG GTCTCCTTCA GCCTGCTGCG GGAGAACAGC CTCTACTGGA ACTACTACAT 2040
 CGACAGCTAC CTCAAGGTC AGAGCCCGGT GGCCTTCGAT CTGCTGCACT GGAACAGCGA 2100
 CAGCACCAAT GTGGCGGGCA AGACCCACAA CAGCCTGCTG CGCCGTCTCT ACCTGGAGAA 2160
 CCAGCTGGTG AAGGGGAGC TCAAGATCCG CAACACCCG ATCGATCTCG GCAAGGTGAA 2220
 GACCCTGTG CTGCTGGTGT GGGCGGTGGA CGATCACATC GCCCTCTGGC AGGGCACCTG 2280
 GCAGGGCATG AAGCTGTTTG GCGGGGAGCA GCGCTTCCTC CTGGCGGAGT CCGGCCACAT 2340
 CGCCGGCATC ATCAACCCG CGGCCGCCAA CAAGTACGGC TTCTGGCACA ACGGGGCCGA 2400
 GGCCGAGAGC CCGGAGAGCT GGCTGGCAGG GCGGACGCAC CAGGGCGGCT CCTGGTGGCC 2460
 CGAGATGATG GGCTTTATCC AGAACCCTGA CGAAGGGTCA GAGCCCGTCC CCGCGCGGGT 2520
 CCGGAGGAA GGGCTGGCCC CCGCCCCCG CCACTATGTC AAGGTGCGGC TCAACCCGT 2580
 GTTTCCTGC CCAACAGAGG AGGACGCCGC ATG AGC GCA CAA TCC CTG GAA GTA 2634

Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val

1

5

GGC CAG AAG GCC CGT CTC AGC AAG CGG TTC GGG GCG GCG GAG GTA GCC 2682

Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg Phe Gly Ala Ala Glu Val Ala
 10 15 20
 GCC TTC GCC GCG CTC TCG GAG GAC TTC AAC CCC CTG CAC CTG GAC CCG 2730
 Ala Phe Ala Ala Leu Ser Glu Asp Phe Asn Pro Leu His Leu Asp Pro
 25 30 35 40
 GCC TTC GCC GCC ACC ACG GCG TTC GAG CGG CCC ATA GTC CAC GGC ATG 2778
 Ala Phe Ala Ala Thr Thr Ala Phe Glu Arg Pro Ile Val His Gly Met
 45 50 55
 CTG CTC GCC AGC CTC TTC TCC GGG CTG CTG GGC CAG CAG TTG CCG GGC 2826
 Leu Leu Ala Ser Leu Phe Ser Gly Leu Leu Gly Gln Gln Leu Pro Gly
 60 65 70
 AAG GGG AGC ATC TAT CTG GGT CAA AGC CTC AGC TTC AAG CTG CCG GTC 2874
 Lys Gly Ser Ile Tyr Leu Gly Gln Ser Leu Ser Phe Lys Leu Pro Val
 75 80 85
 TTT GTC GGG GAC GAG GTG ACG GCC GAG GTG GAG GTG ACC GCC CTT CGC 2922
 Phe Val Gly Asp Glu Val Thr Ala Glu Val Glu Val Thr Ala Leu Arg
 90 95 100
 GAG GAC AAG CCC ATC GCC ACC CTG ACC ACC CGC ATC TTC ACC CAA GGC 2970
 Glu Asp Lys Pro Ile Ala Thr Leu Thr Thr Arg Ile Phe Thr Gln Gly
 105 110 115 120
 GGC GCC CTC GCC GTG ACG GGG GAA GCC GTG GTC AAG CTG CCT 3012
 Gly Ala Leu Ala Val Thr Gly Glu Ala Val Val Lys Leu Pro
 125 130
 TAAGCACCGG CGGCACGCAG GCACAATCAG CCCGGCCCT GCCGGCTGA TTGTTCTCCC 3072
 CCGCTCCGCT TGCCCCCTTT TTCGGGGCAA TTTGGCCAG GCCCTTCCC TGCCCCGCCT 3132
 AACTGCCTAA AATGGCCGCC CTGCCGTGTA GGCATTCATC CAGCTAGAGG AATTC 3187

【0108】配列番号：11

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

AGTCCCGCC TCGGTGTGG GTGAA

25

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0109】配列番号：12

配列の長さ：25

配列の型：核酸

配列：

GGCATATGCG CTCATGCGGC GTCCT

25

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0110】配列番号：13

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

GCCATATGAG CGCACAATCC CTGGAAGTAG

30

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0111】配列番号：14

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CTGGATCCG CCGGTGCTTA AGGCAGCTTG

30

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0112】配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

配列：

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys Arg
 1 5 10 15
 Phe Gly Ala Ala
 20

【0113】配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

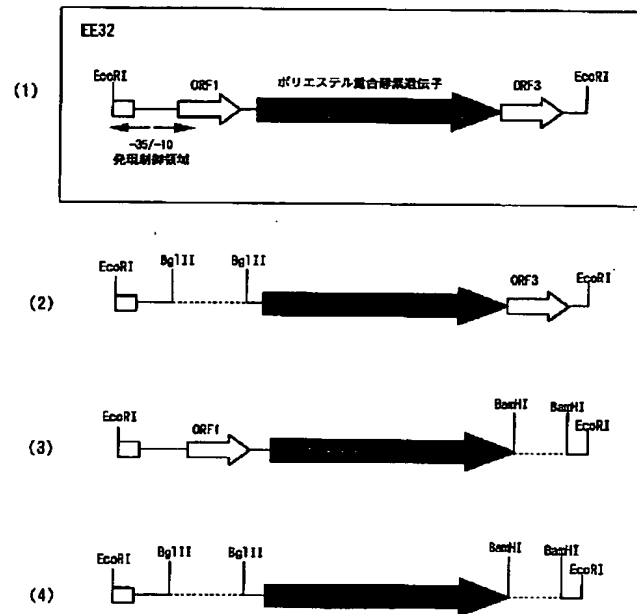
Met Ser Ala Gln Ser Leu Glu Val Gly Gln Lys Ala Arg Leu Ser Lys
 1 5 10 15
 Arg Phe Gly Ala Ala
 20

【図面の簡単な説明】

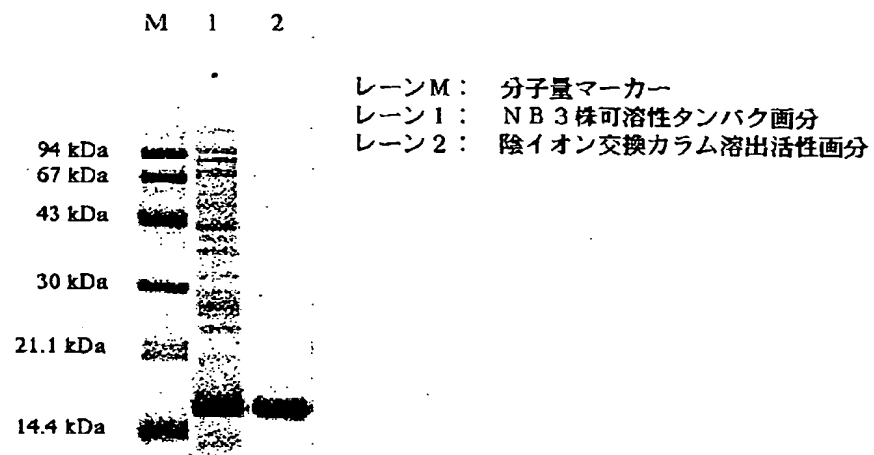
【図1】本発明の遺伝子の構築図である。

【図2】SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す写真である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

//(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:05)
(C 1 2 N 9/88
C 1 2 R 1:05)
(C 1 2 P 7/62
C 1 2 R 1:05)